

# Auxin Action in a Cell-Free System

Nihal Dharmasiri,<sup>1</sup> Sunethra Dharmasiri,<sup>1</sup>

Alan M. Jones,<sup>2</sup> and Mark Estelle<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology

Indiana University

Bloomington, Indiana 47405

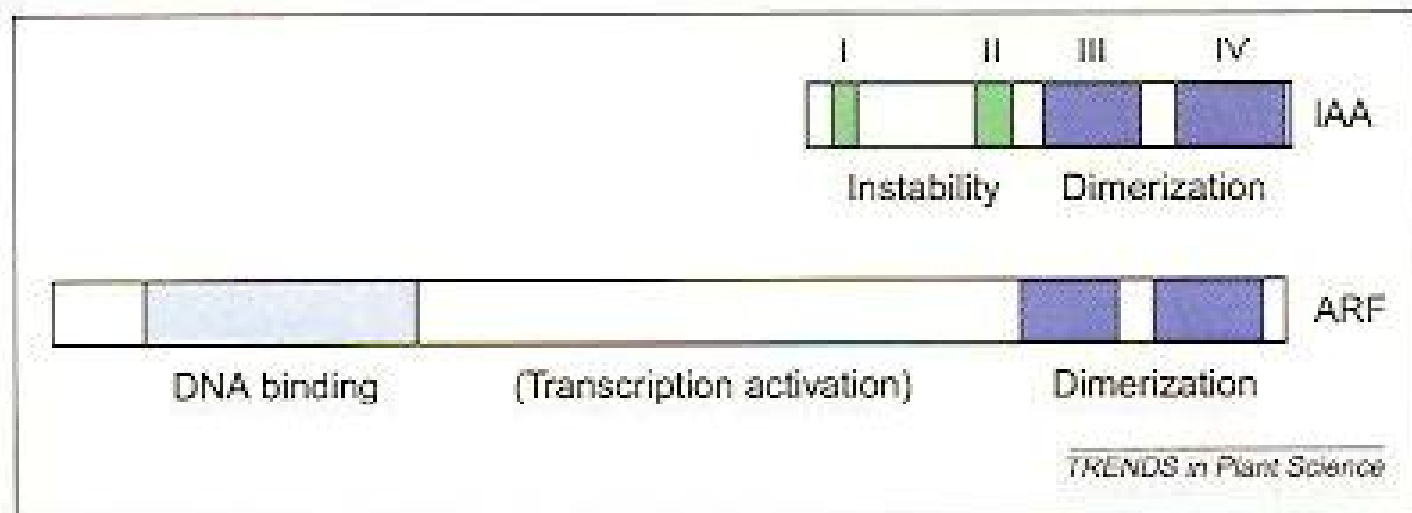
<sup>2</sup>Department of Biology

University of North Carolina

Chapel Hill, North Carolina 27599

# Was wir wissen:

- Auxin fördert Abbau von Aux/IAA -Proteine  
> vermittelt zwischen Aux/IAA und Ubiquitin  
Protein Ligase E3 oder SCF<sup>TIR1</sup>
- Aux/IAA interagieren mit ARF (Auxin Response  
Factors) über konservierte Domäne III und IV ->  
Heterodimere
- ARF binden direkt an DNA  
(Transkriptionsfaktoren) und werden von Aux/IAA  
negativ reguliert



# Was wollen wir herausfinden?

- Identität und Lage des Auxin- Rezeptors?
- Phosphorylierung für SCF<sup>TIR</sup>- Aux/IAA Bindung nötig?
- Welche Rolle haben konservierte Proline in Domäne II ?

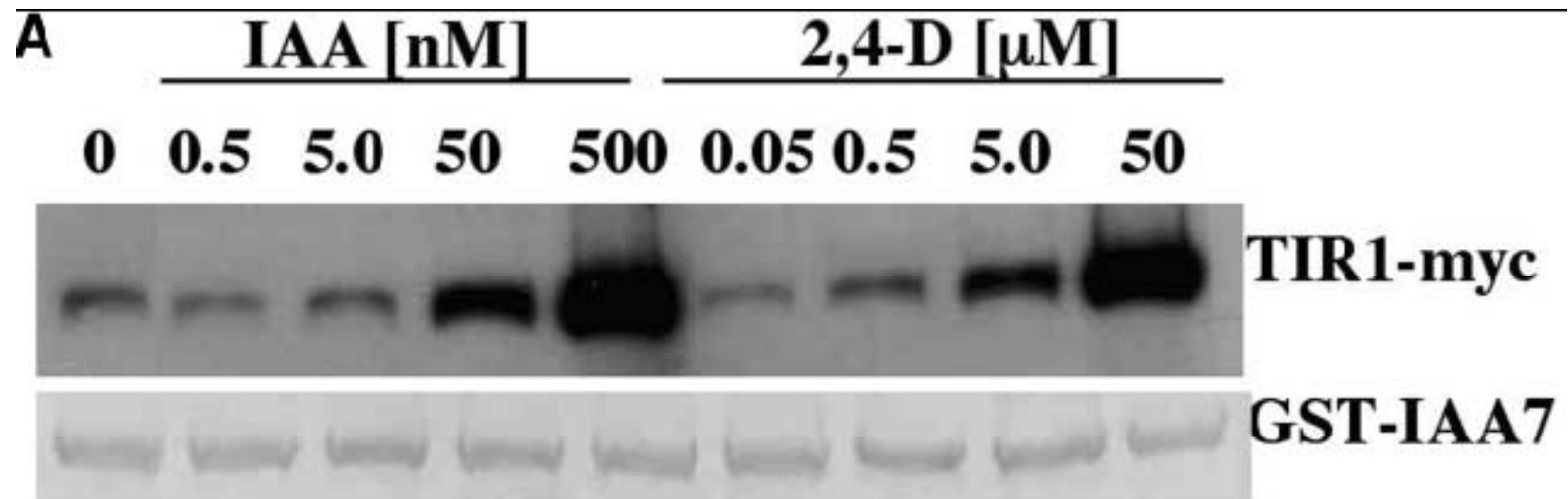
# ABP1 (Auxin bindendes Protein)

- > Kandidat als Auxin Rezeptor?

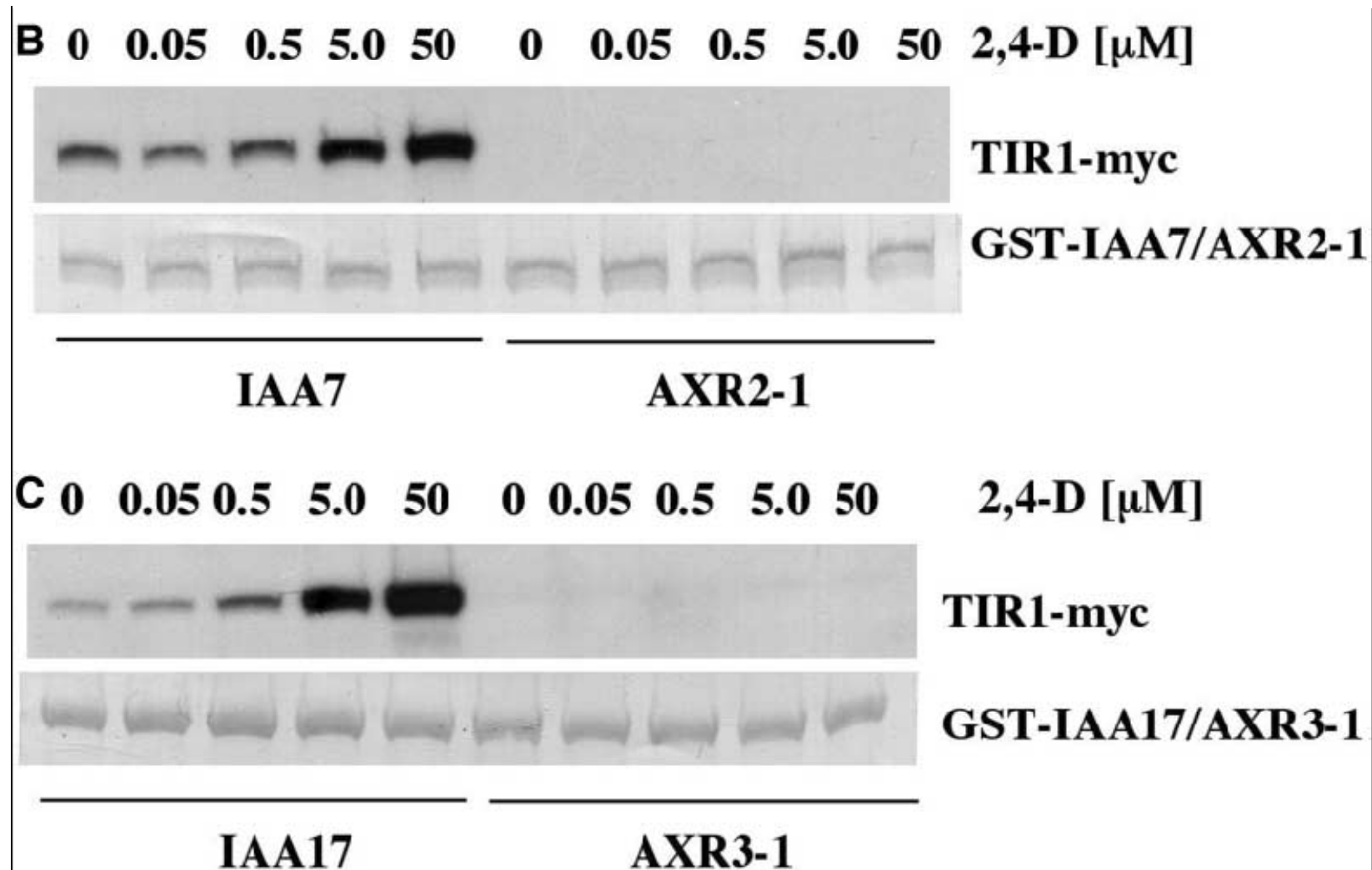
- Schon länger bekannt
- Hohe Affinität zu Auxin
- befindet sich hauptsächlich am ER (membrangebundenes Protein)

# Auxinwirkung in zellfreiem Extrakt

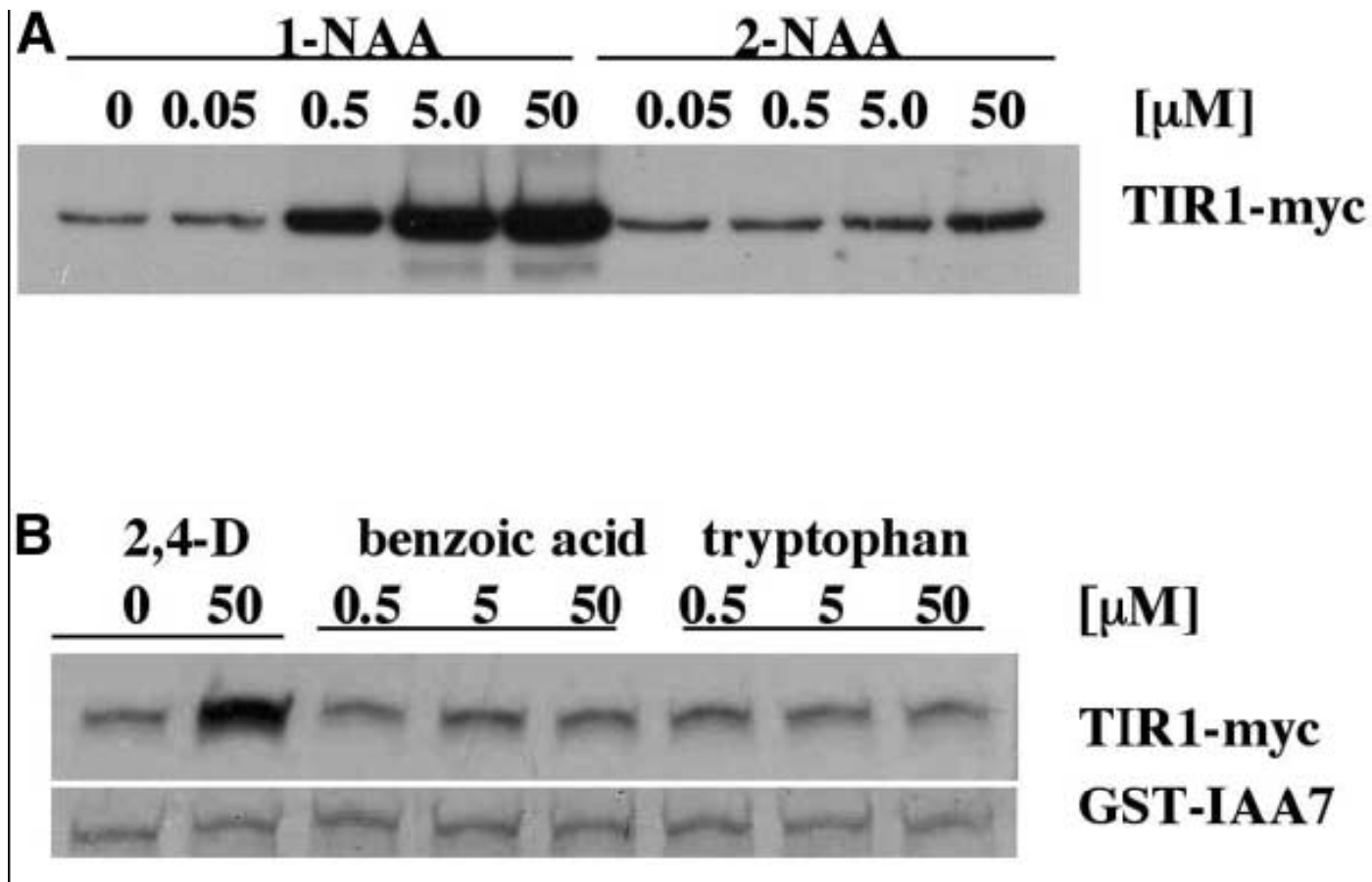
- myc-tagged TIR1 (TIR1-myc) + Glutathionin-S-Transferase Fusionsprotein (GTS-IAA7)+IAA oder 2,4-D



- ARX2-1 u ARX3-1 Mutanten (AS Ersatz in IAA7 u IAA17) + TIR1-myc + 2,4-D



# Aktivität von Auxin und verwandten Verbindungen

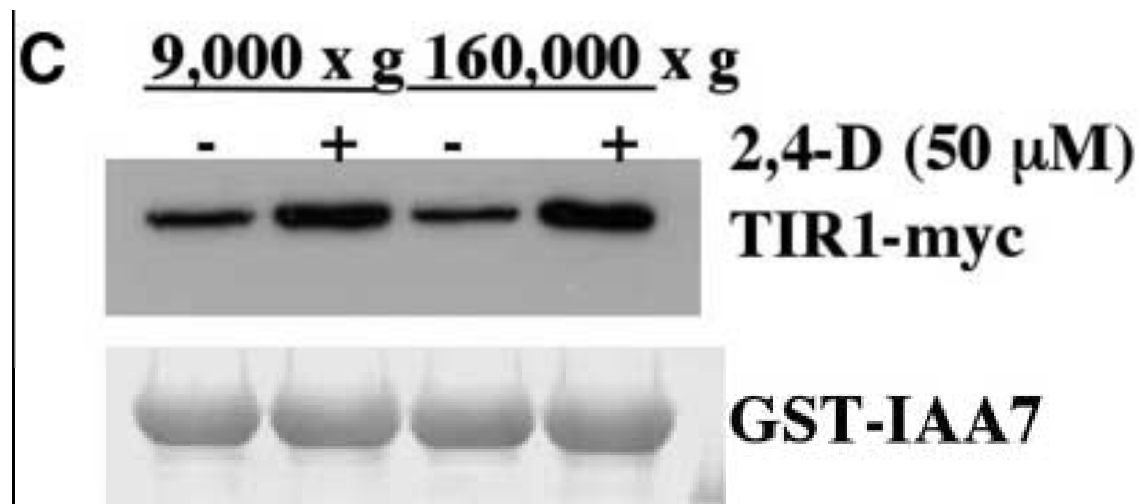




- 2-NAA, Benzoessäure u Thryptophan  
-> nicht biologisch aktive Auxine
- Auxin braucht keine intakten Zellen für  
SCFTIR1-AUX/IAA Bindung

Sind Membranbestandteile nötig für  
die Auxin abhängige Bindung von  
AUX/IAA?

- Low-speed Zentrifugation -> enthält Membranen und Membranassoziierte Proteine (9.000 x g)
- High- speed Zentrifugation -> keine Membran oder assoziierte Proteine (160.000 x g)



- Auxinrezeptor ist im Cytoplasma gelöst und nicht an Membran gebunden
- Auxin Regulation des AUX/IAA Abbaus  
-> Hormone und ein oder mehrere gelöste Proteine einbezogen

ABP1 = Auxinrezeptor?

- mit Antikörper ABP1 aus Arabidopsis eliminiert

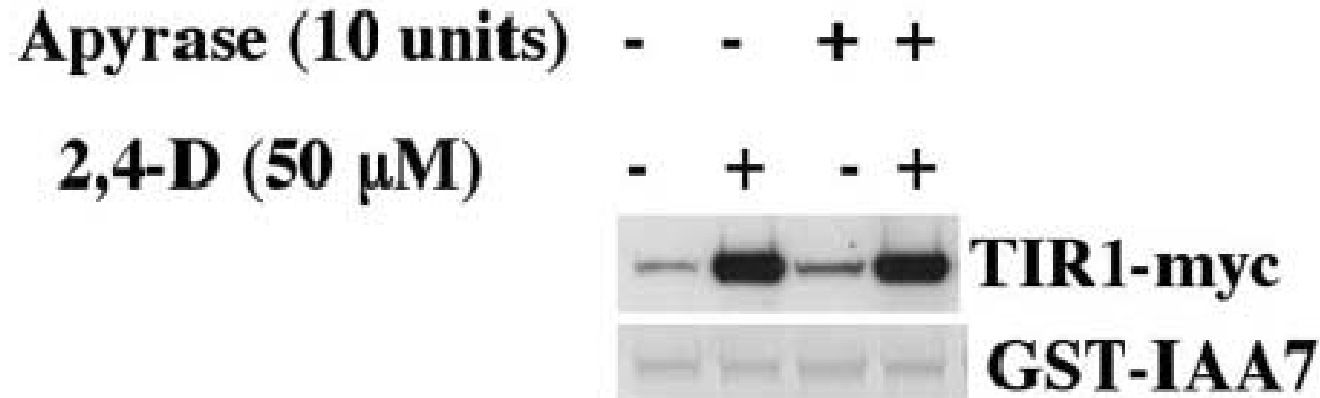
GST-IAA7 pull down -> Level von TIR1-myc unverändert

- Zugabe von ABP1 -> kein Effekt auf Auxin Antwort

-> ABP1 nicht verantwortlich für die Auxin Regulation von SCF<sup>TIR1</sup>-AUX/IAA Interaktion

# Rolle der Protein Phosphorylierung

- um auszuschließen, dass SCF<sup>TIR1</sup>-AUX/IAA Bindung ATP verbraucht -> Zugabe von Apyrase
- Apyrase = plasmamembran gebundene Enzym, katalysiert die Hydrolyse von ATP zu AMP und anorganischem Phosphat

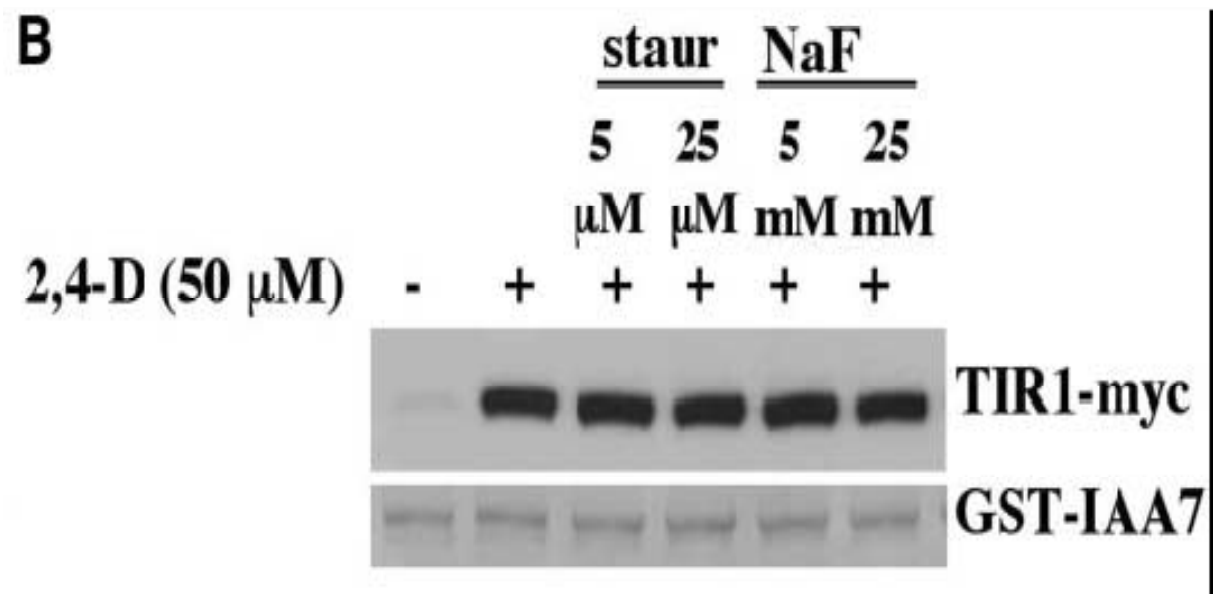


- > Apyrase hat keine Effekte auf die Auxin induzierte SCF<sup>TIR1</sup> - IAA7 Interaktion
- > Phosphorylierung in Domäne II im AUX/IAA Protein hat keine Auswirkung

nicht auszuschließen, dass Interaktion von einem oder mehreren phosphorylierten Proteinen verursacht wird

- Staurosporin  
(Protein  
Kinase  
Inhibitor)

- NaF  
(Phosphatase  
Inhibitor)



kein Effekt auf die Auxin Aktivität

-> Phosphorylierung ist nicht in  $\text{SCF}^{\text{TIR1}}$ -IAA7  
Bindung beteiligt

# Rolle der konservierten Proline in Domäne II

Tiersystem: Erkennung von HIF $\alpha$  von E3  
durch Hydroxylierung von Prolin

-> Hydroxylierung wichtig für Erkennung von  
Aux/IAA?



## Prolylhydroxylase Inhibitoren:

- $\text{Co}^{2+}$  (1mM), DMOG (4mM), DLP (10mM)
- Interaktion zw. GST-IAA7 und TIR1-myc getestet

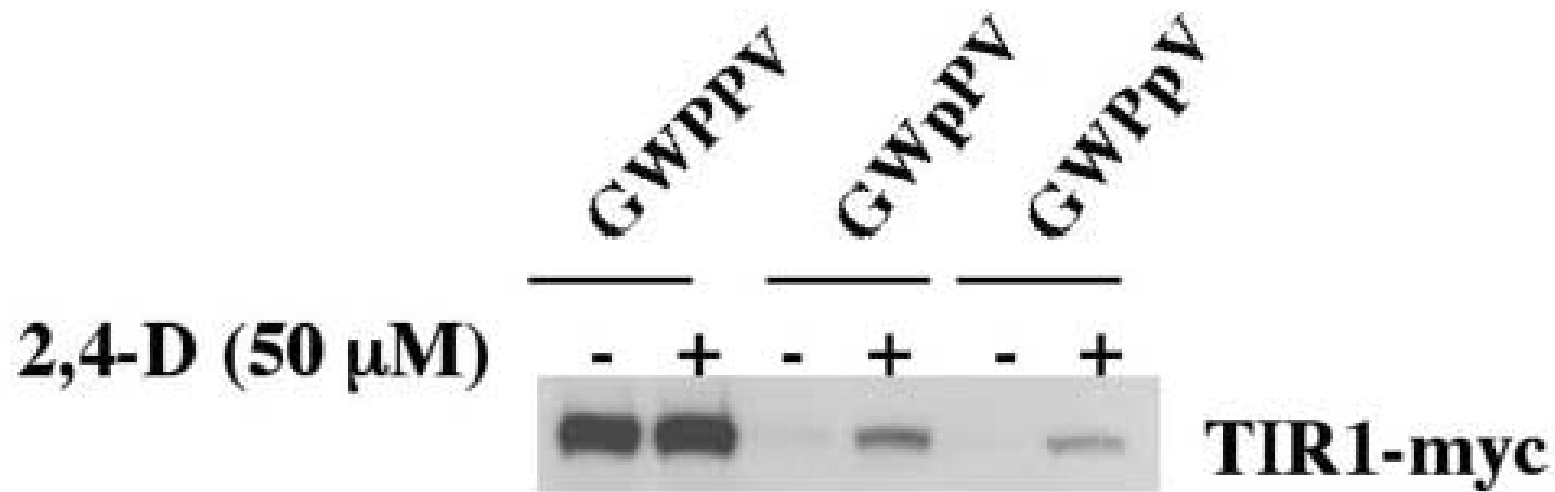
-> Keine Beeinflussung

-> Auxin reguliert nicht Prolin- Hydroxylierung

Synthese von 3 Peptiden: AS 73-88 von IAA7 (Domäne II mit pro-81 u. pro-82) und Biotintag am N-term.

1. Peptid -> WT
2. Peptid -> pro-81 hydroxyliert
3. Peptid -> pro-82 hydroxyliert

Extrakt + TIR1-myc  $\pm$  2,4-D



Peptid mit 2 hydroxylierten Prolinen

-> keine WW mit SCF<sup>TIR1</sup>

-> Auxinregulation von Aux/IAA ist nicht abhängig von Prolin-hydroxylierung

# PPlase an Auxinantwort beteiligt?

## Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase:

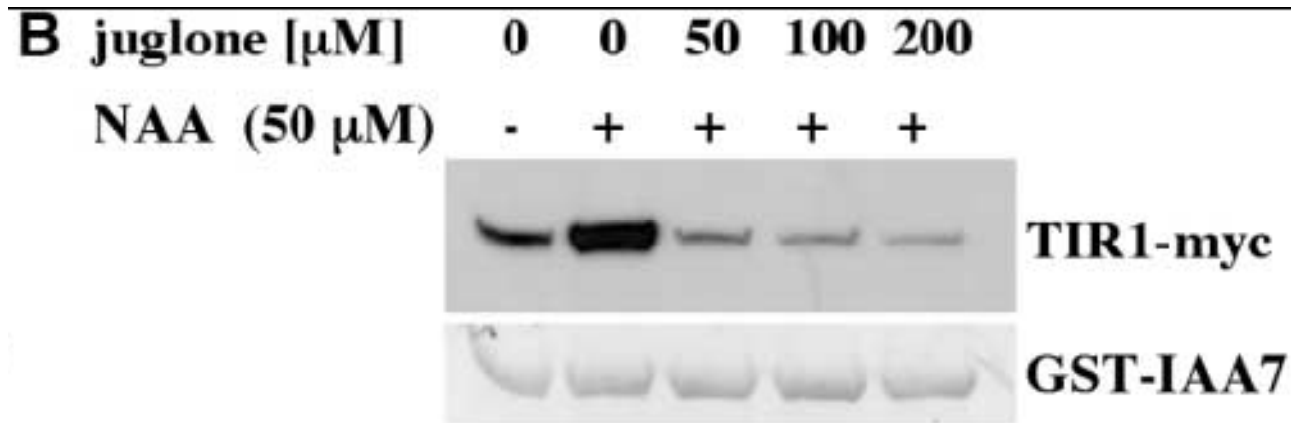
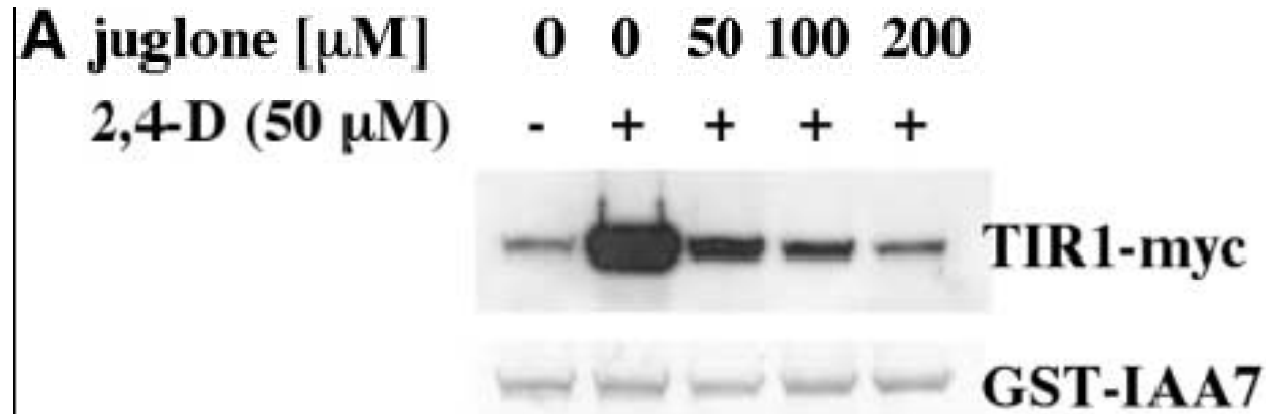
- Katalysiert cis-/trans-Umwandlung von Prolin-Imid-Peptidbindungen
- essentielle Rolle bei der Proteinfaltung (Chaperon-Funktion) ( $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblattbrecher)

## PPlasen und ihre Inhibitoren:

Cyclophiline -> Cyclosporin

FK506bp -> Rapamycin

Parvuline -> Juglone



-> PPlasen der Parvulinegruppe könnte für WW nötig sein

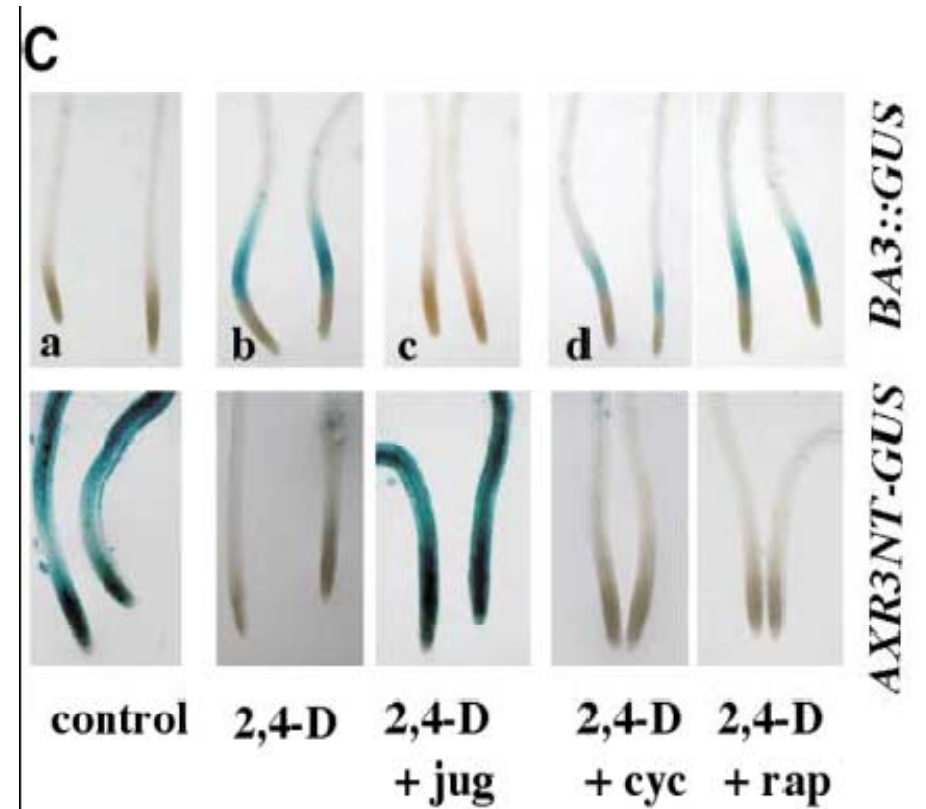
# Untersuchung des Juglone-effekts in vivo

Auxinreporter

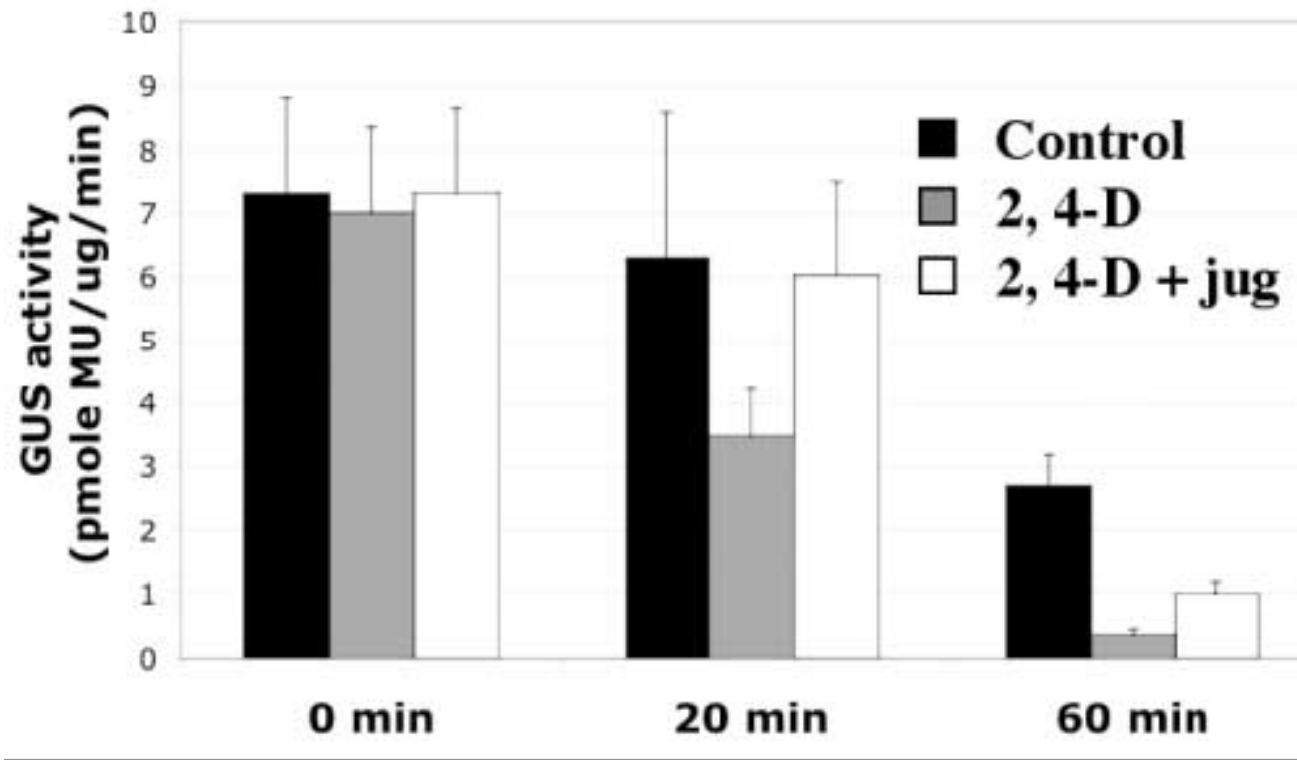
BA3::GUS + 2,4-D  $\pm$   
Juglone, Cyclosporin,  
Rapamycin

Fusionsprotein

AXR3NT-GUS (mit  
Hitzeschockpromotor)  
+ 2,4-D  $\pm$  Inhibitor



**D**



-> Juglone verhindert den Auxin abhängige Abbau von AXR3NT-GUS